

SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME

Patent Number: JP63119500
Publication date: 1988-05-24
Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03
Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD
Requested Patent: JP63119500
Application Number: JP19870125443 19870522
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04
EC Classification:
Equivalents: JP2544136B2

Abstract

NEW MATERIAL: A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98; N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = -37$ or -1 deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 (cm^{-1}); KBr; solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

USE: A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

PREPARATION: For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of $\geq 15 \times 10^4$ are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

Data supplied from the esp@cenet database - 12

③ 日本国特許庁(JP)

④ 特許出願公開

⑤ 公開特許公報(A)

昭63-119500

⑥ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑦ 公開 昭和63年(1988)5月24日

C 07 K 15/14
A 61 K 31/725ABL
ABY

8318-4H

7252-4C ※ 審査請求 未請求 発明の頁 5 (全13頁)

⑧ 発明の名称 硫酸化多糖体DS 4152並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

⑨ 特 願 昭62-125443

⑩ 出 願 昭62(1987)5月22日

優先権主張 ⑪ 昭61(1986)5月23日 ⑫ 日本(JP) ⑬ 特願 昭61-118847

⑭ 発 明 者 井 上 和 彦 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑮ 発 明 者 田 中 紀 子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑯ 発 明 者 是 永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑰ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

⑱ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

最終頁に続く

明 細 書

ガラクトース標準)

1. 発明の名称

蛋白含量(%): 1 ± 0.5 (ローリー・フォ

硫酸化多糖体DS 4152 並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

リン法、牛血清アルブミン標準)

2. 特許請求の範囲

(4) 比旋光度

1. ナトリウム塩として下記の物理化学的性質を有する硫酸化多糖体DS 4152。

 $(\alpha)_D^{20} -37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (0.5%水溶液)

(5) 紫外線吸収スペクトルにおける主要吸収有

(ii) 分子量(ゲルろ過法による)

1240, 840(肩), 810(cm^{-1} ; KBr)22000 \pm 3000

(6) 溶解性

(iii) 元素分析値

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

には殆ど不溶。

N 0.51~0.59% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

(7) 着色反応

(iv) 糖および蛋白質の含量

フェノール-硫酸、アンスロン-硫酸、ビ

糖含量(%): 57 ± 3 (フェノール-硫酸法、

ムレット反応およびローリー・フォリン反応

は陽性。水溶液のエルソン・メルガン反応およびムンヒドリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3% 炭酸水溶液)

(9) 糖成分および炭酸基、窒素の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、30.4%

およびP(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:81:73:6である。

(10) 糖アミノ酸およびアミノ酸

炭加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイソレウシン酸、グルコサミンおよびムラニン酸の存在を認める。

次の図表第5項記載の血管新生抑制剤。

4 炭酸化多糖体DP 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する抗腫瘍剤。

5 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規な炭酸化多糖体DP 4152並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤並びにこれと共にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤に関する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、シロコフカスDP 47-25の発酵生産物中に腫瘍抑制作用、感染抑制作用およびインターフェロン誘起作用を有する炭酸化多糖体DP 4639 が存在することが知られて

2 炭酸化多糖体DP 4152 を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

3 リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、糖尿病性関節炎、未熟児網膜症に有効な特許請求の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。

4 炭酸化多糖体DP 4152 を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

5 炭酸化多糖体DP 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

6 ステロイドが糖質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類から選ばれたものである特許請求の範囲第6項記載の血管新生抑制剤。

7 リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、糖尿病性関節炎、未熟児網膜症に有効な特許請求の範囲第7項記載の血管新生抑制剤。

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-25329号)。

本発明者らは、種々の有用性の期待される炭酸化多糖体DP 4639 について生物学的特性を明らかにすべく検討をかねてつた結果、DP 4639 が強い発癌性を有することを知つた。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この発癌性物質を除去すべく、更に研究をかねてつたところ、DP 4639 は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちのDP 4152 と名づけられた一成分は発癌性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用を有することを見出した。

更にまた、本発明者は、このDS 4152 とステロイド剤とを組合せると血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用が相乗的に増強されることを見出した。

本発明は、上記の如見に基づくものであり、その目的は、新規に免疫化多糖体DS 4152を提供するものである。

また、本発明の他の目的は、免疫化多糖体DS 4152を有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

更に、本発明の他の目的は、免疫化多糖体DS 4152とステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

本明細書中の「血管新生抑制」とは、迄の

発育、実体形成、創傷の治癒等に極めて重要なだけでなく、調節リユーマを含む慢性炎症、免疫応答、腫瘍増殖等の病的状態においてもその病体の進展に深く関与している血管の新生作用を抑制することをいう。したがって、血管新生抑制剤は、上記血管の新生作用が関与する腫瘍症、例えばリユーマ性関節炎、増殖性網膜炎、乾眼、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症等の治療、予防に有用なものである。特に腫瘍は強い血管新生を促し、新生された血管より供給される血液がさらに腫瘍の増殖と進展を促進するとされているので、抗腫瘍剤としても有効である。

本発明の免疫化多糖体DS 4152は、アルスコパクター 19.A7-25 (工業技術院生

物工業技術研究所には、Microsome 19.A7-25として、PERM P-5255及びAntibacterial 19.A7-25としてPERM SP-1357の番号で委託されている)の培養物から分離されるDF 4639 (特開昭56-67301号参照)から、その中に含まれる分子量約 1.5×10^4 以上の発熱性物質等を適当な分子量分離法、例えばゲルろ過法や限外ろ過法、アルコール沈降法で除くことによつて得られる。

すなわち、ゲルろ過法によればDF 4639を適当なゲルろ過担体、例えば、セファクリル (Sephacryl S-300 (ファルマシア製))を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクションについて高速ゲルろ過クロマトグラフィ

(東洋ソーダ製63000 SWカラム使用)を行い、排除限界(ボイド・ボリューム、void volume)にピークを示すフラクション(2画分)とボイド・ボリュームにピークを示す分子量の約 $2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ の範囲に抽出されるフラクション(1画分)をそれぞれ、透析する。

また、限外ろ過は適当な膜(例えばAmicon社製のYM10、YM30、XM50、PM30やMilliro社製のNOVA100、OMEGA100、NOVA50、OMEGA50等特にYM10)を用い、窒素ガスによる加圧またはペリステリフク(peristaltic)ポンプによつて加圧(0.5~5 kg/cm²程度)し、透過液をDS 4152として集めればよい。使用液温は、水-エタ

特開昭63-119500(4)

C 24.42~25.70% N 3.34~3.98%

H 0.51~0.89% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

(1) 糖および蛋白質の含量

糖含量(%): 5.7 ± 3 (フェノール-硫酸法、ガラクトース標準)

蛋白質含量(%): 1 ± 0.5 (ローリー・フォリン法、牛血清アルブミン標準)

(4) 比旋光度

$(\alpha)_D^{25} -37^\circ \pm 1^\circ$ (0.5%水溶液)

(5) 紫外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯
1240, 840 (nm), 810 (cm^{-1} ; KBr)

(6) 溶解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

ノール(10:2~3)または水が適量であり、4℃乃至室温で行なうのが一般的である。

得られた各透析内液を最終後ろ通し、ろ液を数倍量のエタノール中に投下することにより生成する白色沈澱を捕め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥すれば、目的とするDS 4152(1画分)と発熱性物質(2画分)が各々得られる。

こうして得られるDS 4152は以下に述べる物理化学的諸性質を示す。下記の物性はそのナトリウム塩についてのものである。

(1) 分子量(ゲルろ過法による)

29000 ± 3000

(2) 元素分析値(300°Fのものを示す)

ルン、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

(7) 呈色反応

フェノール-硫酸、アンスロン-硫酸、ビュレット反応およびローリー・フォリン反応は陽性。水溶液のエルソン・カルガン反応およびユンヒドリン反応も陽性。カルベソール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3%炭酸水溶液)

(9) 構成糖および炭水化物、糖の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、30, H₂O
およびP(糖)の含有率比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

(10) 構成アミノ酸およびアミノ酸

炭加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイノビリン酸、グルコサミンおよびムン酸の存在を認める。

炭上のDS 4152は、後記実施例で示す如く、単独でも血管新生抑制作用を有するものであるが、ステロイド剤と組合せることにより、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤にかいては、DS 4152の代りにヘパリン、低分子ヘパリン等を使用することもできる。

従来、アレドニソロン、6-メチルアレドニソロン、デキサメタゾン等のステロイドホルモンが、癌促進剤、発がん剤、ヘムステ

一順位に実験的に誘導された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている

(Cancer Res. 39 1308 (1979) J. Hall,

Cancer Lett. 57 769 (1976) 及び Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 78 1176 (1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、雄質コルチコイド(プレドニゾン、プレドニソン、メタメナゾン等)は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、前立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロステンを母核とする男性ホルモンであるテストステロンプロピオネート、フルオキシメステロン等が抗乳癌薬剤として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている(Osborne 10 72 (1984))。

ゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート、フオスフェート、ブチルアセテート、テトラヒドロフタレート、トリメチルアセテート等)；メチルプレドニゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート等)；メタメナゾンおよびその誘導体(フオスフェート、バレレート等)が挙げられる。

また、グルココルチコイドのC-11位の水酸基が=配位になつた異性体(たとえば、11 β -エピヘイドロコルチゾン)も含まれるし、前記グルココルチコイドのテトラヒドロ代謝物(グルココルチコイド活性の有無は関係しない)も含まれる。

更に、黄体ホルモンであるプロゲステロン、

更にまた、プロゲステロンの誘導体、テストステロンの誘導体およびエストロゲン類が前立腺癌の治療に用いられている。

前記の08 4152 と組合せ用いることのできるステロイド類は、雄質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類等であり、より具体的には次のものが例示される。

(1) プレグナンを母核とするステロイドホルモン、すなわちグルココルチコイドであり、たとえばコーチゾンおよびその誘導体(アセテート、エナンテート、ウンデシレート等)；ヘイドロコルチゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート、カプロエート等)；プレドニゾンおよびその誘導体；プレドニ

メドキシプロゲステロンおよびその誘導体(アセテート等)；ダイドロゲステロンおよびその17 α -アセトキシ誘導体(デュフアストン)等が挙げられる。

更にまた、メタラコルチコイドであるアルドステロン、デソキシコルチコステロンおよびその誘導体(アセテート、トリメチルアセテート、エナンテート、フエニルプロピオネート等)も挙げられる。

(2) アンドロステンを母核とするステロイドホルモン、すなわち、男性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンおよびその誘導体(プロピオネート、エナンテート、ブチレート、カプリレート等)が挙げられる。また、エピテストノールおよび

その誘導体、ヒビテオスチンがあげられる。
さらにフルオキシメステロンおよびその誘導体、メチルメステロンおよびその誘導体、メノロンおよびその誘導体も含まれる。

(3) エストランを母核とするステロイドホルモン、すなわち、妊娠ホルモンであり、たとえば、エストロンおよびその誘導体、エストラジオールおよびその誘導体（ベンゾエート、ジプロピオネート、バレレート、ウンデセンエート等）、エストリオールおよびその誘導体（トリプロピオネート等）があげられる。

本発明の血管新生抑制剤の剤型としては、有効成分を医薬的に許容される媒体、賦形剤を含有する種々の形態、例えば水または各種の増液用製剤に溶解させた散剤、錠剤、錠剤

である。注射による投与の場合は通常経口の1/5量が適量である。

また、本発明の血管新生抑制剤を抗癌剤として用いる場合の投与方法及び用量も、たは上記と同じである。

(発明の効果)

本発明の DS 4152 はそれ単独でもつても血管新生抑制作用を有するが、これを更にステロイド剤と組合せるとより優れた血管新生抑制作用を有する。

したがって、DS 4152 単独でもつても血管新生抑制剤として有用であるが、更にステロイド剤と組合せたものは相乗的に作用が増大されるので、例えば癌腫血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生抑制剤として特

用、錠剤、注射剤、坐剤等が挙げられる。

本発明の血管新生抑制剤が DS 4152 とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記用途の単剤に調製して組合せ剤とすることも、あるいは両成分を混合剤とし製剤化することもできる。

本発明の血管新生抑制剤は、静脈内、お椀内、経口、皮下、直腸内、粘膜内または患部局所内に投与することができる。その投与量は、成人の経口一日量で、DS 4152 としては1~2000mg程度であり、ステロイド類は男性ホルモン系、副腎コルチコイド系で10~1000mg、送与30~60mgが適量で、漸減していくのが好ましいことがある。プロゲステロン系では100~1200mgが適量

に有用なものである。

(実施例)

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

実施例1 (A)

特開58-87301号に記載の方法により得られた DP 4639 (50F) を1.5Mの0.1M NiCl_2 に溶解し、これを0.1M NiCl_2 で平衡化したカラム（セファクリルS-300；50×80cm）にかけて同濃度にて溶出し、1.8Mずつ層出液を集めた。得られたフラクションについて高速ゲル浸透クロマトグラフィー（水泳ソーブ 93000 SWカラム、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液 pH 6.5）を行い、メイル・ディュームKビーグを与えず、

特開昭63-119500(7)

分子量(ゲストラン標準)が約 2×10^4 ~ 8×10^4 の範囲に属するフラクシオンを調り(約700ml)、脱イオン水に対して透析した。透析内液を約50mlまで濃縮後ろ過した。ろ液を約400mlのエタノール中へ沈降下層下して、生成した沈降を調り、これを90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(50℃、6時間)して目的物のDS 4152の白色粉末3.6gを得た。

一方、上記高濃ゲル透過クロマトグラフィーでポリド・ポリニウムにピークを有するフラクションを調り(約90ml)、上述のDS 4152の場合と同様に処理して、E成分を白色粉末として0.16gを得た。

(4) ガラクトース、グルコース、保護基および糖の組成モル比

試体を1規定塩酸中100℃で5時間加水分解しイオン交換樹脂で脱塩処理した後、常法によりアルジトールアセテートとしてガスクロマトグラフィーで分析した。また、保護基および糖のモル比は、SおよびPの含量(%)から算出した。

第2表

	ガラクトース	グルコース	保護基	糖
DS 4152	0.1	1.0	7.3	0.6
DP 4639	0.2	1.0	7.3	0.6
E成分	0.2	1.0	0.9	0.6

第2表は、グルコースを1.0モルとした場

DS 4152の物理化学的性質および生物学的性質をDP 4639およびそのE成分と比較して示す。

(4) 糖、蛋白、SおよびP含量(第1表)

第1表

	1) 糖(%)	2) S(%)	3) 蛋白(%)	4) P(%)
DS 4152	56	11.1	1.1	0.88
DP 4639	54	10.8	1.3	0.86
E成分	42	7.9	7.6	0.72

1) フェノール-保護法(ガラクトース換算)

2) アントノビラスの方法(C.A. Antospectrosc., *Acta Chem. Scand.* 16, 1521 (1962))による

3) ローリー・フォリン法(牛血清アルブミン換算)

4) ケエンらの方法(P.S. Keen et al., *Anal. Chem.* 28, 1756 (1956))による

各成分のモル比の1例である。

(4) 糖成分のモル比およびアミノ糖の同定

DS 4152を3規定塩酸中、100℃で16時間加水分解した後、常法によりアミノ糖分析計にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シアミノピロリドン酸、グルコサミンおよびムラミン酸のピークを認め、

(4) 比旋光度: $(\alpha)_D^{20}$ (c=0.5, 水)

第3表

	比旋光度
DS 4152	-37
DP 4639	-36
E成分	-34

(4) ゲル透過層出パターン

第1図、第2図および第3図に、それぞれ

あると推定される。

(N) 発熱性試験

日本薬局方(第10改正)に準じて行つた発熱性試験の結果を第4表に示す。

DS 4152、DP 4639 およびH部分の高濃ゲル透過クロマトグラムを示す(東洋ソーダ製63000 8号カラム使用、溶媒Q14、移動カラム温度45、40ml/分、標準物質デキストランT-10およびT-40)。

(i) 紫外吸収スペクトル

2mg/ml水溶液において220~340nmに極大吸収は認められず。

(ii) 紫外吸収スペクトル (KBr錠)

1240、840(肩) および810 cm^{-1} に、炭化多環に特徴的な吸収を示す。

DS 4152 の構造としては、主としてD-ガラクトースとD-グルコースから成る糖質部分にムライン酸フェスフェートを介してメチルグリカン部が結合した炭化多環体

以下余白

試 体	用量 mg/10ml	体外上昇度					
		時刻	020	010	015	045	計
DS 4152	75	020	020	060	016	045	045
DP 4639	375	020	020	060	020	090	090
H部分	15	020	020	060	020	090	090
	75	020	020	060	020	090	090
	15	020	020	060	020	090	090
	75	020	020	060	020	090	090

・+ (陽性)、- (陰性)

(i) DS 4152 の急性毒性(マウス、静注)は、LD₅₀が2000mg/kg以上でつた。

実施例1(加)

DP 4639 (20g)を300mlの水-エタノール(10:3)溶液に溶解し、YM10膜(41.6 μm 、アicon社製)を用いて、室温で加圧(1.5 kg/cm^2)下、室温で限外ろ過した。上記ろ過液を逐次しながら透過液量が約3Lとなるまでろ過した。透過液の濃縮液(約50ml)に100mgの酢酸ナトリウムを加えて溶解した後、遠心分離により得られる上清を約500mlのエタノール中へ投下し下した。生成した沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(55 $^{\circ}\text{C}$ 、5時間)してDS 4152

63-113500 (9)

08 4182 と同一である。

樹皮量	50%
土量	1.3%
腐敗土量	0.9%
P 含量	0.92%

又ハ、バリンを添加し、37℃で培養した。

菌物を2日後に、培養液の5%の濃度を生菌培養液の5%を添加した好菌と比較し、37℃で培養し、50%の濃度で生菌を添加した。(10%濃)を算出した。

子量 0.92%
 重量パーセント、0.1%程度より
 7.1%程度 (H₂O), 0.8% (分)。

为肝或胆管血管增生阻止其数(直道法)：

046-42-616 1433333

(Kaiser 297:307, (1982) (Oxford 1-1

其後同2と同様にして、ヌチロイド
03 4182 を採用した組合の数はついで同

へた。スチーフとしては、映画コーナンを0.8、/ 脚圧0.8（空留生に影響のない量）用いた。また、比較として、D7 4030及びミニ画分についてもその特性を調べた。この結果を第8図に示す。

❧ ❧ ❧

(३०५) कृष्णकलापः ५०६

08 4162	08 4630	000	000
000	000	000	000

[illegible]

50-718302	252	020 (8)
7484142902	124	012 (103)
178-219184-4	198	028 (70)
11847042902	112	042 (27)
7042902	102	049 (21)
7194188	100	001 (1000)
4814712	080	005 (160)
68-144442902	115	003 (383)
7042902	130	006 (143)
714253-471	110	016 (68)
3-471749-1	120	017 (218)
5044	104	034152 (204) 204 (104)
10. 重 (10/10000)		

❖ ❖ ❖

特開昭63-119500 (10)

実施例5

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

DS 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR 系雄マウスに皮下もしくは経口で投与し、6 時間後に血液を採取した。0.313% ナエン酸ナトリウムで凝固を阻止し、直接法と同様に 5 日の受精期卵巣原液に添加し、2 日後に判定した。この結果を第 7 表に示す。

第 7 表

投与ルート	投与量 (mg/kg)	血管新生阻止率 (%)
経口	3	-5.9
	30	26.4
	300	62.7
皮下	3	1.6
	30	37.6
	300	66.1

第 8 表

投与ルート	DS 4152	DP 4639	E 百分
皮下	92.2%	83.3%	86.8%
経口	92.7%	88.6%	62.6%

DS 4152 および DP 4639 は経口、皮下いずれの経路によっても卵巣原液血管新生を抑制することが認められた。

実施例7

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

ICR 系雄マウスに、生理食塩水に溶解した DS 4152 を経口投与した。ステロイドは、DS 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水に溶解して経口または筋肉内投与した。投与 6 時間後に採血し、0.313% ナエン

この結果から明らかに、用量依存的な血管新生抑制作用が認められた。

実施例6

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

実施例5と同様に、ステロイドと DS 4152 を併用した場合の効果について調べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン 5 mg/kg の割合で用い、DS 4152 は 30 mg/kg 又は 300 mg/kg となるよう調整して加えた。また、比較と CDP 4639 及び E 百分を用いた。この結果を第 8 表に示す。なお、表中の数値は、生理食塩水を同量投与した対照マウスより採取した血液を添加した卵巣原液血管の発達度を 100% とした時の阻止率である。

酸ナトリウムで凝固を阻止し、これを直接法と同様に 5 日の受精期卵巣原液に追加、2 日後に血管新生に及ぼす効果を確認した。結果は、同量の生理食塩水のみを投与したマウスの、6 時間経過後の血液を加えた場合の卵巣原液血管の発達度を対照とし、阻止百分率で示した。この結果は第 9 表の通りである。

以下余白

特開 63-113500 (11)

実施例 8

試験方法：

C57BL/6 雄マウスに同系の雌鼠由交配水腫鼠 M5076 を 1×10^6 個皮下接種し、3 日目より DS 4152 を 30 ㎖/4 日 1 回 6 回皮下投与したところ、著大な抗腫瘍効果と生存日数の有意な延長が認められた。すなわち第 10 表に示すように移植 21 日目の腫瘍平均重量は対照群の 37% (63% 抑制) であり、かつノディアン生存日数が対照群より 33% 延長した。

腫瘍平均重量は、腫瘍長の長軸と短軸の長さを測定し、以下の式から求めた。

$$\text{腫瘍平均重量} = (\text{長軸}) \times (\text{短軸})^2 \times \frac{1}{2}$$

実施例 9

試験方法：

ICR 系雄マウス (5 週齢) にテラコマ 160 (8160) を 1×10^6 個皮下接種し、3 日目より酢酸コナソンの生理食塩水懸濁液を 250 ㎖/4 日/回の割合で 3 日間、100 ㎖/4 日/日の割合で 1 日投与した。

DS 4152 は生理食塩水に溶解し、0.6 l もしくは 0.1 ㎖/マウスとなる様 1 日 1 回皮下もしくは腹腔にて 4 日間投与した。移植 7 日目に屠殺して腫瘍重量を対照と比較したところ第 11 表に示す如く酢酸コナソンのみで投与した群では腫瘍重量は生理食塩水投与群と差がなかったが、さらに DS 4152 を投与することにより著大な増殖阻止作用が得ら

第 9 表

物質名 (ルート)	投与量 (㎖/4)	DS 4152 投与量 (㎖/4; p.p.)	生存日数 (%)
コナソリンアセテート (p.p.)	0	0	77
		30	75.1
サトウハチロー (p.p.)	1	0	-26
		30	71.7
	0	0	-123
		30	80.7
エタナスタノール (l.m.)	0	0	40
		30	52
	0	0	18.4
		30	23.4
	100	0	24.2
		30	37.0

第 10 表

腫瘍系	群	投与量 (㎖/4)	腫瘍重量 (mg/4) (a)	生存率 (%) (b)
M5076	対照群	0	230±0.18 (100)	0
	DS 4152 投与群	30	089±0.09 (37)	33

(a) 移植 21 日目の平均腫瘍重量 ± 標準偏差、(b) は平均生存率。

(b) (a) 低投与群のノディアン生存日数/対照群のノディアン生存日数 - 1) × 100

れ、対照剤の純度重量の99~125%であつた。

表11例

試 料	純度重量	
	平均値±標準偏差	T/C%
生理食塩水 (p.p.)	Q361±Q191	1000
生理食塩水 (s.s.)	Q391±Q122	1000
酢酸コチゾン	Q340±Q162	942
DS 4152 (Q61mg/..... p.p.)	Q361±Q070	1000
DS 4152 (Q1mg/..... p.p.)	Q261±Q077	723
DS 4152 (Q61mg/..... p.p.) +酢酸コチゾン	Q063±Q016	175°
DS 4152 (Q1mg/..... p.p.) +酢酸コチゾン	Q028±Q011	74°
DS 4152 (Q61mg/..... s.s.)	Q322±Q071	824
DS 4152 (Q1mg/..... s.s.)	Q356±Q115	906
DS 4152 (Q61mg/..... s.s.) +酢酸コチゾン	Q063±Q036	161°
DS 4152 (Q1mg/..... s.s.) +酢酸コチゾン	Q036±Q016	69°

°P<Q05, °°P<Q01 ステューデントt-検定による

試料を注射剤とする。

実用例12

投与:

DS 4152 6mg、アレフェゾン20mg、乳剤50mg、トクモコシアンテン135mg、カルバキチンメルロースカルシウム5mg、ヒドキシアロピルメルロース3mg及びステアリン酸マグネシウム0.5mgを常法に従つて混合、打錠し、1錠とする。

4. 図面の簡単な説明

第1図をいし第4図は高速ゲル透過クロマトグラムである。

以上

実用例10

調製:

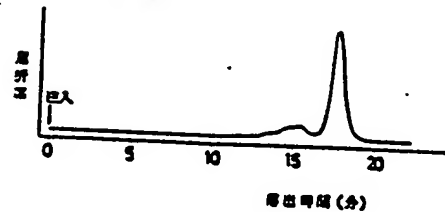
DS 4152 6mg、乳剤300mg、トクモコシアンテン144mg、カルバキチンメルロースカルシウム30mg及びヒドキシアロピルメルロース20mgを用い、常法に従つて500mgの調製剤を調製した。この調製剤は錠状にあわせて1850.0mg~5mgを服用する。

実用例11

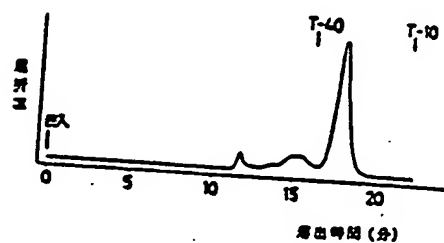
注射剤:

DS 4152 12mg、塩化ナトリウム90mgを注射用蒸留水に溶解し、10mlとする。この溶液をノンブランフィルターでろ過した後、アンプルに充填し、115℃で30分間

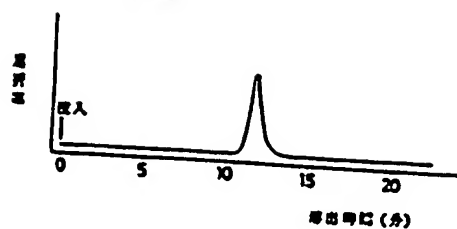
第1図



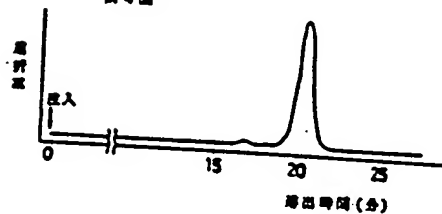
第2図



第3図



第4図



第1頁の続き

④Int. Cl.⁴

A 61 K 31/725
37/02
C 08 B 37/03
C 12 P 19/04
H(A 61 K 31/725-
31:56)

識別記号

ADU
ABE

庁内整理番号

8615-4C
6779-4C
C-8515-4B
7252-4C

発明者 小 河 秀 正

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究
所内